



Universidade Nova de Lisboa

Análise por RAPD-PCR de genes envolvidos na
resistência ao Praziquantel em *Schistosoma mansoni*

Ana Rita Pinheiro de Sousa Figueira

FEVEREIRO, 2012



Universidade Nova de Lisboa

Análise por RAPD-PCR de genes envolvidos na
resistência ao Praziquantel em *Schistosoma mansoni*

Ana Rita Pinheiro de Sousa Figueira

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, ESPECIALIZAÇÃO EM BIOLOGIA
MOLECULAR E MEDICINA TROPICAL E INTERNACIONAL**

Orientador: Investigadora Doutora Ana Júlia Afonso

Co-orientador: Professora Doutora Manuela Calado

FEVEREIRO, 2012

*“Às vezes, em sonho triste,
Aos meus desejos existe
Longinquamente um país
Onde ser feliz consiste
Apenas em ser feliz.”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer de forma especial à minha mãe pelo carinho e amizade, pela escuta activa e partilha de ideias mesmo que por vezes não compreenda os porquês de todos os meus discursos, e pela sua incessável procura de me transmitir a necessidade da excelência. Ao meu pai, pois todo orgulho que ele tem em mim faz com que todos os dias eu procure novos conhecimentos.

À Professora Doutora Maria Amélia Grácio pelos conhecimentos ministrados e pelo contínuo interesse demonstrado no decorrer da realização desta Dissertação.

À Professora Doutora Silvana Belo pela disponibilidade dedicada e pela leitura interessada deste estudo.

À minha orientadora Investigadora Doutora Ana Júlia Afonso pela disponibilidade diária, pela energia transmitida e pela partilha de conhecimentos científicos que permitiram definir melhor os meus objectivos profissionais.

À Professora Doutora Manuela Calado, co-orientadora deste trabalho, pela motivação transmitida e incansáveis sugestões e inquirições sobre resultados experimentais obtidos.

À Técnica Especialista de Laboratório Isabel Clemente na Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica/Helminologia do IHMT/UNL pelo sorriso de todos os dias e pelas técnicas ensinadas.

Ao colega Tiago Mendes e a todos os colaboradores da UEIPM do IHMT pelo companheirismo e experiências de laboratório partilhadas.

E por último, mas não menos importante, ao Mário Correia e à minha avó pela paciência, dedicação e motivação, e aos meus amigos e família, em especial à minha tia paterna, pelo apoio e curiosidade demonstradas acerca da minha dissertação.

RESUMO

[ANÁLISE POR RAPD-PCR DE GENES ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA AO PRAZIQUANTEL EM SCHISTOSOMA MANSONI]

[ANA RITA PINHEIRO DE SOUSA FIGUEIRA]

PALAVRAS-CHAVE: Praziquantel, Polimorfismo, Resistência, RAPD-PCR, *Schistosoma mansoni*, Susceptibilidade.

A Schistosomose é uma doença parasitária, transmitida por parasitas da classe Trematoda, do género *Schistosoma*. A doença afecta cerca de 207 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo em particular as crianças e as mulheres as mais vulneráveis à infecção. A cronicidade desta doença tornou-se um importante problema de Saúde Pública a nível mundial, afectando as actividades diárias do homem e consequentemente o crescimento económico dos países em vias de desenvolvimento.

A identificação e caracterização de marcadores moleculares que possam estar envolvidos no processo de fenótipo de resistência a fármacos em qualquer das fases do ciclo de desenvolvimento parasitário constituem um importante desafio para a melhoria do tratamento farmacológico e controlo da Schistosomose.

Este estudo tem como objectivo contribuir para a distinção através da técnica de RAPD-PCR de possíveis polimorfismos existentes entre cercárias produzidas a partir de moluscos infectados com miracídios obtidos de vermes adultos fenotipicamente sensíveis ou resistentes ao Praziquantel.

A utilização da técnica de biologia molecular RAPD-PCR permitiu identificar e analisar a existência de bandas polimórficas, através da comparação dos padrões de bandas obtidos em gel de poliacrilamida a 6%, representantes de amplificação do DNA, extraído de cercárias produzidas a partir de moluscos infectados com miracídios obtidos de vermes adultos sensíveis ou resistentes ao Praziquantel utilizando vários *primers* distintos.

Foram utilizados 7 *primers*, previamente descritos por Tsai *et al* (2000), como tendo uma boa eficácia na amplificação de amostras de DNA de *Schistosoma mansoni* tendo alguns deles a particularidade de darem origem a padrões diferenciados nas bandas obtidas após electroforese de DNA de cercárias obtidas para os ensaios de resistência e sensibilidade ao fármaco Praziquantel.

Os resultados obtidos, ainda que preliminares, indicam já uma variação genética entre os dois ensaios de resistência e sensibilidade ao Praziquantel.

ABSTRACT

[RAPD-PCR ANALYSIS OF GENES IN THE RESISTANCE TO PRAZIQUANTEL IN SCHISTOSOMA MANSONI]

[ANA RITA PINHEIRO DE SOUSA FIGUEIRA]

KEYWORDS: Praziquantel, Polymorphism, Resistance, RAPD-PCR, Schistosoma mansoni, Susceptibility.

Schistosomiasis is a parasitic disease, caused by a Trematode species of the *Schistosoma* genus. This disease affects approximately 207 million people worldwide, especially women and children, who are most vulnerable to the infection. The chronicity of this disease not only became an important international Public Health issue but also affects the daily activities of humankind and, consequently, the economic growth of developing countries.

The identification and characterization of molecular markers, which may be part of the drug-resistant phenotype process in any stage of the parasite development cycle, are an important challenge for the improvement of the pharmacological treatment and control of Schistosomiasis.

Hence, the object of this dissertation is to use the RAPD-PCR technique to distinguish potential different polymorphisms among cercariae produced from miracidium-infected molluscs obtained from adult worms that are susceptible or resistant to Praziquantel.

The use of this RAPD-PCR molecular biology technique allowed identifying and analysing the existence of polymorphic bands through the comparison of the band patterns obtained through 6% polyacrylamide gel representing DNA amplification extracted from cercariae produced from molluscs infected with miracidium from adult worms that are susceptible or resistant to Praziquantel, using different primers.

Seven primers were used, which were previously described by Tsai *et al* (2000) as being highly efficient in the amplification of *Schistosoma mansoni* DNA samples, some with the particularity of creating different band patterns in the bands obtained after DNA Electrophoresis of cercariae obtained for the Praziquantel resistance and susceptibility tests.

Despite being preliminary, the results achieved show a genetic variation between both the Praziquantel resistance and susceptibility tests.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
<i>Abstract</i>	v
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	xi
Abreviaturas.....	xii
1. Introdução	14
1.1. Importância da Helminologia.....	14
1.2. Importância do Filo Platyhelminthes	15
1.2.1. Género <i>Schistosoma spp.</i>	16
1.3. Generalidades sobre a espécie <i>Schistosoma mansoni</i>	17
1.3.1. Morfologia do Parasita.....	17
1.3.2. Ciclo de Vida	19
1.4. Generalidades sobre o hospedeiro intermediário de <i>Schistosoma mansoni</i>	21
1.4.1. Género <i>Biomphalaria sp.</i>	22
1.5. Schistosomose	23
1.5.1. Epidemiologia e distribuição geográfica	23
1.5.2. Clínica	25
1.5.3. Resposta imunológica na schistosomose	26
1.5.4. Diagnóstico	27
1.5.4.1. Diagnóstico Directo.....	28
A. Kato-Katz.....	28
B. Método de raspagem rectal, biópsia hepática e ultra-sonografia....	28

1.5.4.2. Métodos Imunológicos.....	28
A. Imunofluorescência.....	29
B. ELISA.....	29
1.5.5. Tratamento farmacológico	30
1.5.6. Factores de transmissão e medidas de protecção e controlo.....	32
1.6. Métodos moleculares	33
1.6.1. PCR.....	33
1.6.2. RAPD-PCR.....	35
1.7. Objectivos	36
1.7.1. Objectivo Geral.....	36
1.7.2. Objectivos Específicos.....	37
2. Materiais e Métodos.....	38
2.1. Selecção e identificação dos murganhos a infectar.....	38
2.1.1. Condições de acondicionamento dos murganhos	38
2.1.2. Administração de Praziquantel	39
2.2. Obtenção de isolados de <i>S. mansoni</i>	39
2.2.1. Recolha de vermes e ovos através de murganhos.....	39
2.3. Dissecção e extracção de DNA de cercárias	39
2.3.1. Extracção do DNA de cercárias através do kit de extracção (QUIamp® - DNA mini kit 1250).....	40
2.3.2. Extracção do DNA de cercárias através do Método modificado de CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide, Amresco ® - C ₉ H ₄₂ NBr) (Adaptado de Stothard 1998)	40
2.4. Amplificação de RAPD-PCR.....	41
2.4.1. Selecção de <i>primers</i> e aplicação da técnica RAPD-PCR.....	41
2.4.2. Gel de Agarose.....	43

2.4.3.	Gel de Poliacrilamida a 6%.....	43
2.4.4.	Análise	44
3.	Resultados.....	45
3.1.	Métodos de extração de DNA	45
3.2.	Quantificação de DNA genómico	46
3.3.	Análise de Polimorfismos através de RAPD-PCR.....	46
3.3.1.	Identificação de polimorfismos.....	46
3.3.2.	Diferenças genéticas entre os ensaios	46
3.3.3.	Análise dos Polimorfismos através do Coeficiente de Dice (<i>S</i>)	50
4.	Conclusão.....	51
	Referências Bibliográficas	54
	ANEXOS.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sobreposição geográfica global de seis Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) mais comuns - Filariose linfática, Oncocercose, Schistosomose, Geohelmintoses e Tricuriose.	14
Figura 2: Quadro síntese da filogenia do Filo Platyhelminthes integrando <i>Schistosoma mansoni</i>	16
Figura 3: Representação de macho (B) e fêmea (A) de <i>Schistosoma mansoni</i> ...	18
Figura 4: 1 e 2 - Ovos de <i>S. mansoni</i>	19
Figura 5: Ciclo de Vida de <i>S. mansoni</i>	21
Figura 6: <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818).....	23
Figura 7: Distribuição geográfica de schistosomoses no mundo em 2009 - Países e áreas de risco.....	24
Figura 8: Criança infectada com <i>Schistosoma mansoni</i>	26
Figura 9: Estrutura química do Praziquantel (fórmula química - C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₂)..	30
Figura 10: Amplificação do DNA de cercárias produzidas por moluscos infectados por miracídios produzidos por vermes de <i>S. mansoni</i> resistentes ao Praziquantel (Er) e cercárias produzidas por moluscos infectados por miracídios	

produzidos por vermes adultos de *S. mansoni* sensíveis ao Praziquantel (**Es**) com o primer **Opi-09**.....47

Figura 11: Amplificação do DNA de cercárias produzidas por moluscos infectados por miracídios produzidos por vermes de *S. mansoni* resistentes ao Praziquantel (**Er**) e cercárias produzidas por moluscos infectados por miracídios produzidos por vermes adultos de *S. mansoni* sensíveis ao Praziquantel (**Es**) com o primer **Opi-12**.....48

Figura 12: Amplificação do DNA de cercárias produzidas por moluscos infectados por miracídios produzidos por vermes de *S. mansoni* resistentes ao Praziquantel (**Er**) e cercárias produzidas por moluscos infectados por miracídios produzidos por vermes adultos de *S. mansoni* sensíveis ao Praziquantel (**Es**) com o primer **Opi-17**.....49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de oligonucleótidos aleatórios seleccionados	42
Tabela 2: Volumes utilizados nas reacções de amplificação das amostras de DNA para cada <i>primer</i> seleccionado.	42
Tabela 3: Condições de amplificação de DNA por RAPD-PCR seleccionado...	43
Tabela 4: Coeficiente de similaridade de Dice (<i>S</i>) aplicada à diferença genética para os dois ensaios (Er e Es)	50

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celcius

ATP – “*Adenosine Triphosphate*” – Trifosfato de Adenosina

BH – Belo Horizonte

CDC – “*Centers for Disease Control and Prevention*” – Centro para Controlo e Prevenção da Doença

d.d. - bidestilada

DNA – “*Deoxyribonucleic acid*” – Ácido desoxirribonucleico (ADN)

EDTA – Solução do ácido etilenodiaminotetraacético

ELISA – “*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*” – Ensaio Imunoenzimático

Er – cercárias obtidas a partir de moluscos infectados por miracídios produzidos por vermes adultos resistentes ao Praziquantel

Es – cercárias obtidas a partir de moluscos infectados por miracídios produzidos por vermes adultos sensíveis ao Praziquantel

EST's – “*Expressed Sequence Tags*”- Etiquetas de sequência expressa

g – gramas

H₂O – água

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

kg – kilograma

mg/kg – miligrama por kilograma

mL – mililitro (10^{-3} Litros)

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

μL – microlitro (10^{-6} Litros)

DTN – “*Neglected Tropical Diseases*” (NTD) – Doenças Tropicais Negligenciadas

OMS – “*World Health Organization*” (WHO) – Organização Mundial de Saúde

PCR – “*Polymerase Chain Reaction*” – Reacção da Polimerase em cadeia

pb – pares de bases

pH – potencial de hidrogénio

p/v – peso/volume

RAPD – “*Random amplification of polymorphic DNA*” – Amplificação aleatória de DNA polimórfico

rDNA – “*Ribosomal Deoxyrribonucleic acid*” – Ácido desoxirribonucleico ribossomal (ADNr)

r.p.m. – rotações por minuto

S. mansoni – *Schistosoma mansoni*

sp. – “*specie*” – Espécie

STH – “*Soil-Transmitted Helminths*” – Geohelminntoses

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TBE – Tris-Borato-EDTA

TRIS – Tri-hidroximetilaminometano

UEIPM – Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica/Helminologia

UV – Ultra-Violeta

V - *Volt*

W - *Watt*

1. INTRODUÇÃO

1.1.Importância da Helmintologia

Mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo está infectado por helmintas (Riet *et al*, 2007) e mais de dois bilhões de pessoas estão em risco de adquirir infecções parasitárias designadas por helmintoses¹ (**Figura 1**), o que representa um terço da população mundial (OMS, 2001), especialmente em países tropicais e subtropicais.

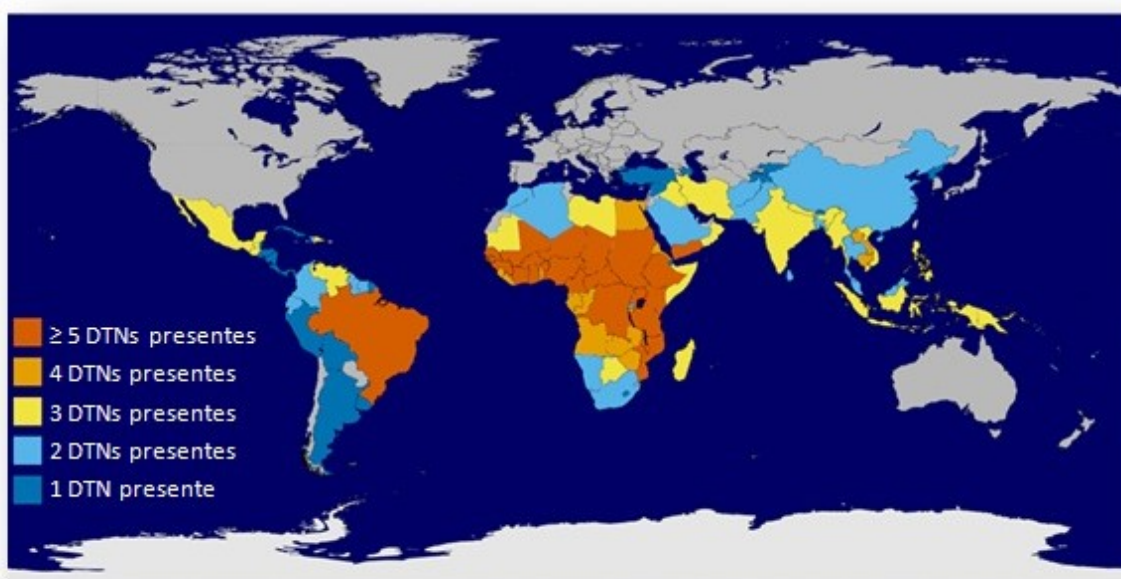


Figura 1: Sobreposição geográfica global de seis Doenças tropicais negligenciadas (DTN) mais comuns - Filariose linfática, Oncocercose, Schistosomose, Geohelmintoses e Tricuriose. **Fonte:** Centro para Controlo e Prevenção de Doença (CDC), 2011.

Os helmintas são organismos eucariotas complexos cujos genomas ainda se encontram por completar sendo processados em ferramentas de bioinformática para consulta (Sousa, 2010; Luke *et al*, 2005). São parasitas que pertencem ao Reino

¹ Exemplos de helmintoses: Filariose linfática (infecção causada pelo nemátode *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori*); Oncocercose (nemátode *Onchocerca volvulus*); Schistosomoses (infecção causada por tremátodes *Schistosoma haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. intercalatum* e *S. mekongi*); e Geohelmintoses (STH), Ascaridiose (nemátode *Ascaris lumbricoides*), Ancilostomose (nemátodes *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*) e Tricuriose (nemátode *Trichuris trichiura*), (OMS, 2001).

Animalia, e ao sub-reino Metazoa, sendo que a maioria destes com importância em medicina se encontram classificados e divididos pelas suas características morfológicas no filo Nematoda e filo Platyhelminthes (Ferreira *et al*, 2002).

Estes agentes de infecção humana têm de um modo geral, grandes dimensões, são especialmente parasitas de vertebrados e não se multiplicam no homem. Alguns invertebrados, moluscos sobretudo, e artrópodes são hospedeiros intermediários e/ou vectores de algumas espécies, sendo necessários para completar o ciclo de transmissão. A existência de transmissão indirecta pode facilitar a reinfeção por helmintas. A resposta imunitária produzida é incompleta o que facilita reinfeção frequente, tendo nos eosinófilos o principal mecanismo de defesa imunológico do hospedeiro humano (Maizels *et al*, 2003)

Estes dois filós incluem-se num amplo grupo de microrganismos intestinais. A via oral é o meio de transmissão preferencial destes parasitas na infecção do hospedeiro; ocupa a superfície da mucosa gastrointestinal, ou atravessa essa barreira (Mulcahy *et al* 2003) e hospeda-se em locais a nível intravascular ou mesmo intracelular (MacDonald *et al*, 2002).

1.2.Importância do Filo Platyhelminthes

O filo Platyhelminthes (do grego *Platy*, achatado + *Helminth*, verme) tem como características gerais agruparem vermes de simetria bilateral e corpo achatado dorsoventralmente que pode ou não ser segmentado (Rey, 2001). São desprovidos de aparelho circulatório, respiratório e esquelético; e o aparelho digestivo é incompleto, terminando no cego. Geralmente são hermafroditas, com órgãos reprodutores bastante complexos.

Este filo possui diversas espécies parasitas do homem e divide-se entre a classe Cestoda e a Classe Trematoda, esta última alberga as seguintes subclasses: Digenea e Monogenea e alguns grupos menores que em outros sistemas de classificação são considerados como uma classe.

Nesta dissertação considera-se a seguinte sistemática (Costa, 2004) já que em termos práticos são habitualmente as espécies que parasitam o homem, (**Figura 2**).

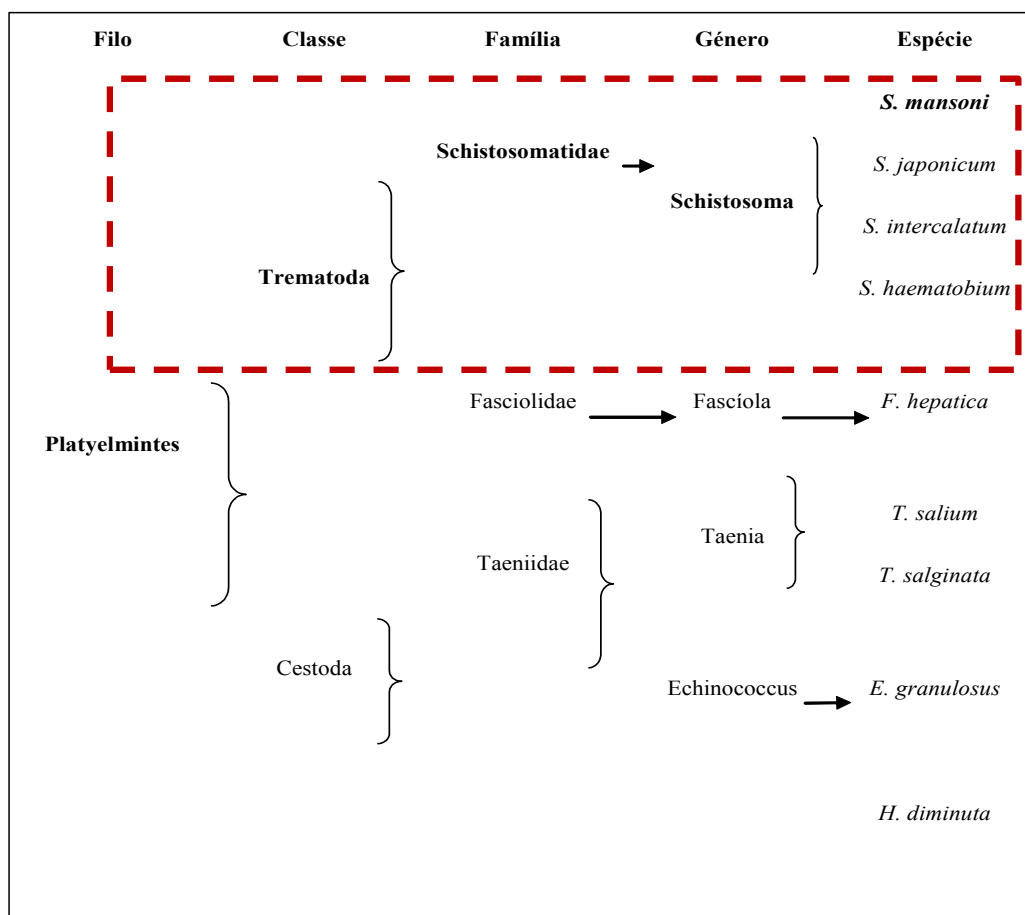


Figura 2: Quadro síntese da filogenia do Filo Platyhelminthes integrando *Schistosoma mansoni*. **Fonte:** Adaptado de *Parasitologia Humana*, 2004.

1.2.1. Gênero *Schistosoma* spp.

Neste filo distingue-se a Classe Trematoda já que incorpora a Família Schistosomatidae onde está incluída a espécie em estudo (**Figura 2**).

Identificam-se fundamentalmente cinco espécies de parasitas de importância médica que provocam a parasitose designada de Schistosomose (ou Bilharziose ou Schistosomíase) sendo elas:

- *Schistosoma mansoni*;
- *Schistosoma haematobium*;
- *Schistosoma japonicum*;
- *Schistosoma intercalatum*;
- *Schistosoma mekongi*.

Segundo Neves *et al*, (2004) foi em 1852 que Birlharz identificou os parasitas designando-os de *Distomum haematobium*. Em 1858, Weinland denominou o género destes Trematodas como *Schistosoma* [*schisto* – fenda e *soma* – corpo], persistindo esta designação até aos dias de hoje.

Estes organismos são endoparasitas e “diferem entre si quanto à sua distribuição geográfica, hospedeiro intermediário e localização anatómica, sendo que o Homem é o principal reservatório e o hospedeiro definitivo” (Ferreira, 2002).

1.3.Generalidades sobre a espécie *Schistosoma mansoni*

A espécie *Schistosoma mansoni*, que produz ovos com esporão lateral, foi identificado por Sambon em 1907 (Neves *et al*, 2004), sendo a espécie que causa a infecção designada por Schistosomose mansónica e/ou intestinal.

1.3.1. Morfologia do Parasita

O ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni* apresenta várias fases que devem ser compreendidas na descrição da sua morfologia: Adulto (Macho e Fêmea), Ovo, Miracídio, Esporocisto e Cercária.

Embora hermafrodita, distingue-se dos restantes tremátodes por apresentarem sexos separados e acentuado dimorfismo sexual (Rey, 2001).

Os machos na extremidade anterior apresentam uma ventosa oral, afunilada e junto desta, uma segunda ventosa designada de ventosa ventral ou acetábulo. A nível longitudinal forma-se um canal designado de ginecóforo. Externamente os vermes adultos são formados por uma citomembrana de sete camadas, sendo a camada mais exterior rica em carboidratos – camada poliônica, constituindo o glicocalix. Os machos visualizam-se comparativamente com as fêmeas, com uma tonalidade branca e mais grossos. Enquanto as fêmeas apresentam uma tonalidade acinzentada, devido à presença de um pigmento – hemozoína, derivado da digestão do sangue, são morfologicamente mais finas e cilíndricas (**Figura 3**).



Figura 3: Representação de macho (B) e fêmea (A) de *Schistosoma mansoni*.
Fonte: <http://www.usuhs.mil>

Na fêmea a ventosa oral e ventral são mais pequenas e menos distantes. O tegumento possui poucos tubérculos, localizados em maior número nas proximidades do extremo posterior. Os vermes adultos vivem no interior dos vasos sanguíneos dos mamíferos (Neves *et al*, 2005)

Possuem aparelho digestivo que se inicia no fundo da ventosa oral, compreende um esôfago sem espessamento muscular mas revestido de células glandulares. No acetábulo o tubo digestivo divide-se em dois ramos simples - direito e esquerdo - que volta a reunir-se em um ceco único, no terço médio do corpo.

O aparelho genital masculino compreende sete a nove massas testiculares situadas dorsoventralmente na região posterior que se abrem para o exterior através do canal ginécoforo. Cada testículo possui um canal eferente, que conecta com o único canal deferente, este dilata originando a vesícula seminal abrindo para o exterior alcançando a fêmea.

No aparelho genital feminino o ovário localiza-se na metade anterior do corpo. Um oviduto curto conduz ao oótipo, que se prolonga através do ducto das glândulas vitelinas, encontrando-se um único ovo quando as fêmeas são fecundadas. O poro genital feminino abre-se ventralmente, pouco atrás do acetábulo. Os dois terços posteriores do corpo estão ocupados pelas glândulas vitelinas e o ceco.

Diariamente cada fêmea fecundada deposita entre cem a trezentos ovos (Rey, 2001). O ovo tem um formato oval, com um pólo anterior mais delgado e possui um esporão lateral. Os ovos embrionados são a forma usualmente encontrada nas fezes e apresentam um miracídio formado (**Figura 4**).

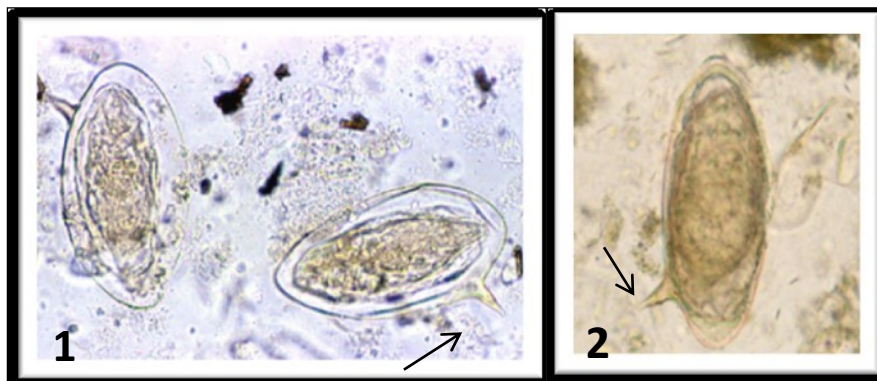


Figura 4: 1 e 2 - Ovos de *S. mansoni*. **Fonte:** Adaptado de Centro para Prevenção e Controle de Doenças (CDC), 2010.

Nos miracídios o sistema excretor localiza-se na extremidade posterior do parasita, tem início nos solenócitos ou células em chama, converge para dois canais longitudinais que terminam num pequeno poro excretor, provida de abertura para o exterior.

As cercárias possuem órgãos de fixação musculosos, as ventosas. Geralmente uma é anterior dispendo-se em torno da abertura oral, e a outra – o acetábulo, de localização posterior e ventral que proporciona abertura para o designado intestino primitivo. São desprovidos de aparelho circulatório, respiratório e esquelético; e o aparelho digestivo é incompleto, terminando no ceco (Neves *et al*, 2004).

1.3.2. Ciclo de Vida

As formas adultas do parasita encontram-se na população humana infectada por esta espécie. Alojам-se no sistema venoso destes, produzindo ovos que atravessam a mucosa do intestino onde através da defecação são expulsos para fontes de água, rios e/ou lagos. Aqui os ovos eclodem e libertam miracídios que infectam os moluscos do género *Biomphalaria* spp.

Os miracídios transformam-se em células germinativas ou reprodutivas designadas de esporocistos que por poliembrionia geram esporocistos-filhos em sucessivas gerações e depois cercárias. À luz, as vesículas tegumentares rompem-se e para o meio líquido libertam cercárias que penetram na pele do Homem que usa a água nas suas actividades diárias. “Um único miracídio pode gerar de 100 a 300 mil cercárias, e cada miracídio já leva definido o sexo das cercárias que serão produzidas” (Neves *et al*, 2004).

Durante a penetração as cercárias perdem a cauda e transformam-se em schistosómulos, que invadem a circulação sanguínea. Uma vez alcançando a circulação podem migrar para o pulmão, onde podem ser retidos e destruídos (Rey *et al*, 2001) ou alcançar o sistema-porta intra-hepático, onde alimentando-se de sangue evoluem de schistosómulos para a forma adulta. Assim, aproximadamente quarenta e cinco dias após a infecção, os vermes adultos residem preferencialmente nas vénulas do plexo hemorroidário superior e nas veias mesentéricas, particularmente a superior, podendo estabelecer-se durante vinte anos no hospedeiro definitivo. Aqui cada fêmea produz aproximadamente 300 ovos por dia (Neves *et al*, 2004), cuja maioria é eliminada através das fezes. Os ovos eclodem e libertam miracídios, forma infectante do hospedeiro invertebrado - molusco; que liberta cercárias, forma infectante do hospedeiro definitivo, o Homem (ou outros vertebrados), cujo contacto com água contaminada permite o estabelecimento da infecção. Inicia-se um novo ciclo de transmissão (**Figura 5**).

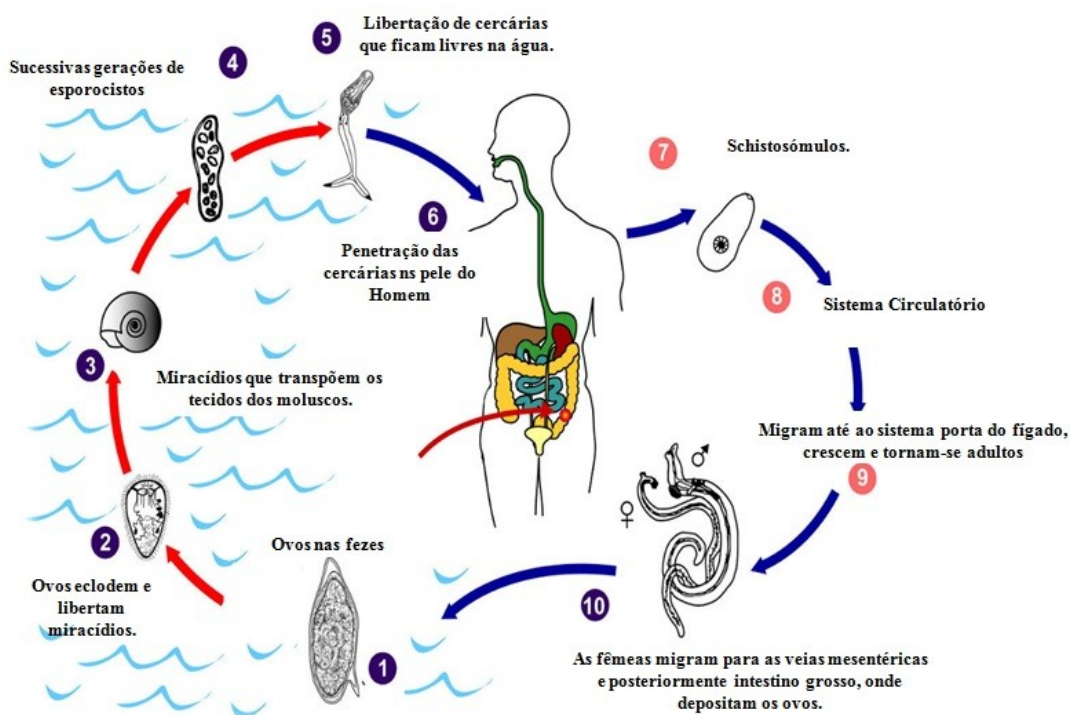


Figura 5: Ciclo de Vida de *S. mansoni*. **Fonte:** Adaptado de Centro para Controlo e Prevenção da Doença (CDC), 2010

A sobrevivência de *S. mansoni* no homem pode ser longa. O parasita na forma adulta é também encontrado ocasionalmente em babuínos, roedores e outros mamíferos (Morgan *et al*, 2005).

1.4. Generalidades sobre o hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni*

A família Planorbidae representa uma das mais importantes famílias de moluscos de água doce (Morgan *et al*, 2002). Três das quatro espécies do género *Schistosoma* requerem moluscos desta família para completar o seu ciclo de vida; pelo que, como hospedeiro intermediário destes parasitas, esta família de moluscos de água doce adquiriu uma evidente importância em saúde pública.

Os moluscos possuem corpo mole, não segmentado e constituem um Filo – o filo Mollusca. A família Planorbidae está inserida na classe Gastropoda, subclasse

Pulmonata e Ordem Basommatophora. Para a identificação destes organismos aspectos como: morfologia da concha; distinção da cabeça, pé, manto e massa visceral; presença de estruturas como a rádula e os órgãos reprodutores são aspectos relevantes.

A relação entre os géneros da família Planorbidae é ainda elementar e baseada essencialmente na anatomia interna e morfologia da concha do molusco. No entanto, segundo um estudo de análise molecular de Morgan (2002), após sequenciação de dois marcadores moleculares; 28S ribossomal e exão 2 do gene que codifica para a actina foi possível construir uma árvore filogenética com 38 taxa representando 16 géneros da família Planorbidae, suportando a teoria de divisão do Planorbidae em duas subfamílias, a Bulinae e Planorbinae, em que alguns dos seus membros desempenham um importante papel como hospedeiros intermediários de *Schistosoma* spp.

Os membros da família Planorbidae apresentam uma concha discoidal, sinistral (ultradextral), globosa ou fisóide. O animal é sinistral com as aberturas pulmonares os genitais situados no lado esquerdo. Os tentáculos são longos, filiformes e cilíndricos, com olhos situados na base. A estrutura do complexo penial é variável, mas constituído sempre de um prepúcio e de um saco vérgico. A rádula é constituída por um dente bicúspide central, dentes laterais grandes bicúspides ou tricúspides e os dentes marginais são compridos, estritos e multicúspides. Uma pseudobrânquia, rodeada pelo colar do manto, altamente vascularizada está presente do lado esquerdo. Os membros desta família possuem hemoglobina na sua hemolinfa e por conseguinte esta apresenta uma cor avermelhada (Malek & Cheng, 1974). Desta família destaca-se o género *Biomphalaria* spp..

1.4.1. Género *Biomphalaria* sp.

O Género *Biomphalaria* tem sido o género com maior destaque entre os estudiosos da sistemática molecular da família Planorbidae devido ao seu reconhecido papel como hospedeiro intermediário de *S. mansoni*.

Estudos actuais sugerem uma origem americana para este género, e com ancestral *Biomphalaria glabrata* (Figura 6), descendendo as doze espécies do continente africano, há cerca de cinco milhões de anos atrás. A introdução do género

Biomphalaria em África pode ter ocorrido mais recentemente, estimando-se entre 1,1-1,8 milhões de anos (Morgan *et al*, 2002), confirmando-se com a evidência fóssil de *Biomphalaria* em África datada de 1-2 milhões de anos identificados por Van Damme, (1984).



Figura 6: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Fonte:** <http://genome.wustl.edu>

Neste género as concha são discóides e bicôncavas, apresentando uma depressão na face superior e na face interior. Possuem sistema respiratório, circulatório, digestivo, excretor, nervoso e sistema genital masculino e feminino.

Na natureza apenas três espécies pertencentes ao género *Biomphalaria* estão identificadas como hospedeiras intermediárias de *S. mansoni*, sendo elas: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*.

1.5.Schistosomose

1.5.1. Epidemiologia e distribuição geográfica

A Schistosomose é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, sendo considerada um dos problemas mais sérios de saúde pública à escala mundial. O que resulta em doença, morbilidade ou mesmo morte (Lambertucci *et al*, 2000).

Cerca de 207 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas, sendo que 5% (180 milhões de pessoas) vive no continente Africano – **Figura 7**. Estima-se que 700 milhões de pessoas estão sob risco em 76 países endémicos, embora a transmissão pareça ter sido interrompida em alguns destes países (OMS, 2011), mantém-se uma

preocupação crescente em países não-endêmicos onde se tem verificado um aumento de transmissão (Coelho, 2010). No Brasil estima-se que cerca de 5 a 6 milhões de pessoas se encontrem infectadas (Rey, 2001).

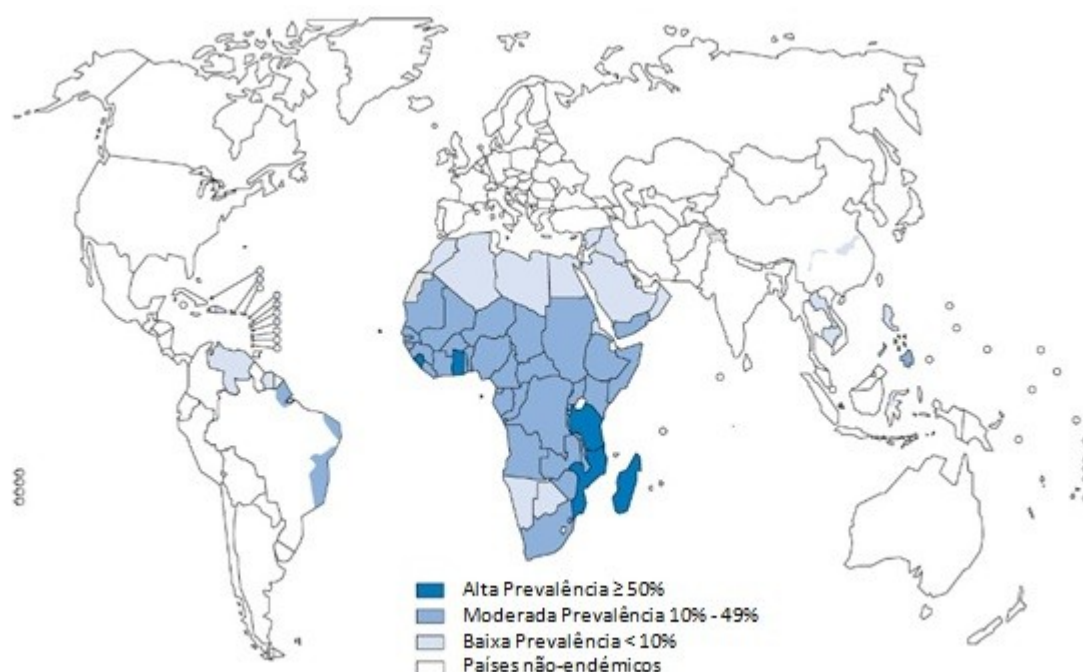


Figura 7: Distribuição geográfica de schistosomoses no mundo em 2009 - Países e áreas de risco. **Fonte:** OMS, 2010.

S. mansoni é um dos agentes etiológicos mais comuns da schistosomose, tendo como hospedeiro intermediário um molusco de água doce do género *Biomphalaria* spp. que condiciona a sua distribuição geográfica (Morgan *et al*, 2005) e consequentemente a sua transmissão.

Segundo Crompton (1999), citado por Steinauer em 2008, mais de 83 milhões de pessoas estarão infectadas. Este parasita atinge principalmente as regiões tropicais e subtropicais, distribuindo-se pela África Central, América do Sul (Brasil) e Caribe e Mediterrâneo oriental (Pontes *et al.*, 2002).

Em 2002 o comité de especialistas de prevenção e controlo de schistosomose e helmintoses da OMS aprovou novas estimativas referentes à mortalidade e mobilidade por *S. mansoni*, concluindo que na África sub-Saariana 54 milhões de pessoas estavam infectadas e 393 milhões de pessoas estariam em risco de infecção.

Esta parasitose atinge principalmente países em desenvolvimento, pobres, com condições higiênico-sanitárias deficientes, cujas actividades laborais da população referem-se ao sector agricolo-pecuária, doméstico e recreativo que as expõe a águas infectadas. Segundo a Organização mundial de Saúde, as faixas etárias com maior índice de infecção e que se encontram em maior risco da fase mais grave da doença são: crianças e mulheres. (OMS, 2001).

A migração e o movimento de refugiados para áreas urbanas do nordeste do Brasil e no continente africano permitiram a introdução da doença em novas regiões, o que contribui para a expansão desta doença. Essencialmente no continente africano, verifica-se que o desenvolvimento de recursos hídricos e de energia hidroelétrica, que tende a acompanhar o aumento populacional, e as alterações ambientais levam a um aumento da transmissão.

1.5.2. Clínica

Através da caracterização do ciclo de vida de *S. mansoni*, compreendemos que pelo seu modo de vida e localização no organismo humano os sintomas são predominantemente intestinais.

É uma parasitose crónica em que a gravidade da doença bem como a sintomatologia clínica está geralmente dependente da carga parasitária, variando consideravelmente segundo o quadro clínico produzido, mas na generalidade dos casos leva a um acentuado *deficit* multiorgânico o que explica a morbilidade e mortalidade da mesma (OMS, 2001).

Esta parasitose na forma aguda pode ser assintomática ou apresentar-se inicialmente como *rash* cutâneo, edema e prurido evoluindo entre o décimo e o trigésimo quinto dia após infecção para febre/calafrios, miastenia, tosse, desconforto abdominal, diarreia e hepatoesplenomegalia discreta.

Após cerca de 120 dias de infecção, há risco de o quadro clínico evoluir para Schistosomose crónica onde surgem grandes variações clínicas como: redução do tamanho dos granulomas, diarreia mucosanguinolenta, fibrose hepática, esplenomegalia, varizes esofágicas e ascite (Neves *et al*, 2004) – **Figura 8**.



Figura 8: Criança infectada com *Schistosoma mansoni*. **Fonte:** <http://www.saude.ce.gov>

1.5.3. Resposta imunológica na schistosomose

A instalação da infecção parasitária está dependente de factores intrínsecos aos hospedeiros, representados em parte pela resistência natural assim como de factores inerentes ao próprio parasita, sendo estes representados por mecanismos de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro, entre os quais alterações morfológicas e bioquímicas.

Assim, *S. mansoni* penetra no hospedeiro com auxílio da sua cauda bifurcada, que é o seu mecanismo mecânico de interacção com o hospedeiro definitivo. No seu interior a sua acção despoleta transformações na actividade metabólica do hospedeiro.

Conhecem-se particularmente três métodos de evasão de *S. mansoni* aos efeitos da resposta imunológica do hospedeiro:

- Mimetismo e aquisição de antígenos do hospedeiro: *S. mansoni* é capaz de induzir a activação de proteínas de coagulação sobre a sua superfície, incorporando de seguida moléculas do hospedeiro dificultando o seu reconhecimento como “non-self”. Esta homologia permite a confusão do sistema imunológico com o próprio organismo infectado.
- Tegumento e modulação da superfície antigénica: A camada externa do tegumento de cercárias e formas adultas constituída por uma camada sincicial de células anucleadas expressa poucos antígenos e contacta directamente com o sistema imunitário do hospedeiro. Estudos mostram

que os schistosómulos perdem a sua superfície cerca de vinte e quatro horas de infecção, esta renovação da membrana celular facilita a evasão ao sistema imunitário.

- Formação de granulomas: Os ovos segregam antígenos solúveis que induzem a mobilização de macrófagos, eosinófilos, e linfócitos e plasmócitos, havendo neste processo a mediação por células CD_4^+ , Th1 e Th2 e linfócitos T e CD_8^+ . Produzem uma resposta imunológica provocando alteração celular, fibrose e necrose, constituindo os granulomas característicos de *S. mansoni*.

Já o hospedeiro apresenta capacidades de resistência através de imunidade não específica e imunidade específica como estratégia imunológica contra o parasita; destacando-se as seguintes:

- Mecanismos de resistência natural e individual;
- Mediadores químicos: favorecem o estabelecimento da inflamação e estimulam a fagocitose;
- Imunidade Humoral: mediada por anticorpos
- Imunidade Celular: mediada por células.

O conhecimento da imunopatogénese e da fisiopatologia do parasita possibilita direccionar mais eficazmente para o diagnóstico da doença e o desenvolvimento de métodos de tratamento farmacológico.

1.5.4. Diagnóstico

Implica o conhecimento do estágio da doença através da anamnese, exame físico e consequentemente exames laboratoriais ou complementares.

No diagnóstico parasitológico de *S. mansoni* existem diferentes métodos: diagnóstico directo, diagnóstico imunológico indirecto e diagnóstico molecular.

1.5.4.1 Diagnóstico Directo

Baseiam-se na pesquisa de ovos nas fezes, biópsia hepática ou raspagem da mucosa rectal e/ou ultra-sonografia (Neves *et al*, 2004).

A. Kato-Katz

Método quantitativo de concentração aconselhado quando existe uma carga parasitémia média a alta. Apesar do seu baixo custo e de ser fácil e de rápida utilização, é caracterizado por ter baixa sensibilidade diminuindo com a intensidade de infecção. Não permite, assim, ser aplicado em áreas de baixa endemacidade.

No entanto, a quantificação dos ovos é importante já que se correlaciona com a gravidade da doença (Ferreira *et al*, 2002.). Assim é benéfica no estudo de populações nas variáveis de eficácia do tratamento, controlo da transmissão e no estudo epidemiológico, pois apesar da grande variedade diária do número de ovos eliminados e contabilizados, a média reflecte com precisão a carga parasitária da população (Neves *et al*, 2004).

B. Método de raspagem rectal, biópsia hepática, e ultra-sonografia:

Permitem uma maior sensibilidade, a verificação mais rápida do efeito do tratamento e a determinação do grau das alterações hepáticas, no caso dos dois últimos métodos. No entanto, apenas são eficazes quando existe carga parasitária média a alta, sendo aconselhadas apenas na fase crónica da doença e em conjunto com outros métodos (Neves, *et al* 2004).

1.5.4.2. Métodos Imunológicos

Estas técnicas permitem avaliar a resposta do organismo ao hospedeiro, frente a antígenos do parasita.

Estudos epidemiológicos em áreas de baixa endemacidade revelaram a manutenção de prevalências residuais da doença, causadas possivelmente por diversos factores inerentes ao controlo da doença. Por exemplo, a utilização apenas de métodos directos, com uma sensibilidade diminuída, contribui para a não detecção de população com baixa carga parasitária (Oliveira *et al*, 2003). Reavaliar os métodos alternativos conhecidos, complementando-os com os já utilizados, sugerem índices de prevalência mais próximos dos reais, contribuindo para uma maior eficácia no controlo da doença.

A. Imunofluorescência

A primeira tentativa para diagnóstico de Schistosomose mediante a utilização da técnica para detecção de anticorpos por imunofluorescência deve-se a Sadun (1960) (Guaraldo *et al*, 1981)

Esta técnica é essencialmente utilizada como método complementar para o diagnóstico individual, e permite uma reacção de imunofluorescência em cortes parafinados de vermes adultos para pesquisa de anticorpos IgM contra antígenos do tubo digestivo (Oliveira *et al*, 2003; Silva *et al*, 1992).

No entanto, a sua execução é complicada e a leitura de resultados demorada, o que faz com que esta técnica não seja utilizadas em estudos epidemiológicos.

B. ELISA

A detecção de anticorpos pode ser útil para identificar a infecção por *S. mansoni* em viajantes provenientes de áreas endémicas e/ou quando o exame directo é negativo, já que este último está dependente directamente da quantidade de fezes examinadas e do número de ovos eliminados pelo portador e/ou para monitorização do tratamento farmacológico (Filho *et al*, 2001). O método de ELISA ao complementar-se com o método directo permite verificar a existência de prevalências residuais, mostrando-se bem adaptado para aplicação em estudos epidemiológicos em áreas de baixa endemacidade (Oliveira *et al*, 2003).

No entanto, apesar de ELISA representar maior sensibilidade e especificidade, existem dificuldades para a padronização deste teste. Este teste está dependente do tipo de antígeno utilizado nas preparações (bruto, purificados, verme adulto, ovo, cercárias), e nas amostras usadas, já que alguns estudos verificaram a presença de reacções cruzadas em amostras de soro de pessoas infectadas com outros helmintas (Uecker *et al*, 2007). O seu uso restringe-se ainda devido à memória imunológica, pois existem anticorpos quer em pessoas tratadas, quer infectadas. A presença de anticorpos é apenas indicativo de contacto com o parasita e não com a infecção realmente activa (Pinto *et al*, 1995), não estando relacionada com o prognóstico da doença, carga parasitária ou estado clínico da pessoa. Aplicando-se não só em estudos epidemiológicos, como também é muito útil na prática diária laboratorial por exemplo, em pessoas com diagnóstico directo negativo, mas com doença crónica e portanto com maior tendência de risco de complicações (Turner *et al*, 2004).

1.5.5. Tratamento farmacológico

Pela dificuldade de encontrar fármacos que apresentem alta eficácia e com efeitos secundários toleráveis, a utilização de novos fármacos tem vindo a ser limitada. Em 1918, iniciou-se a introdução de fármacos derivados dos sais de ácido antimónico, seguido da hancantona, que apesar de actuarem com eficácia ocasionavam efeitos secundários graves (Novaes *et al*, 1999). Em 1972, as indústrias E. Merk e Bayer A.G., seleccionaram o Praziquantel (**Figura 9**) por este, exibir baixa toxicidade, maior eficácia, segurança e tolerabilidade entre outros compostos testados.

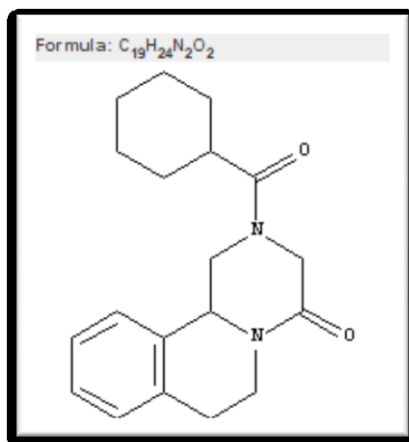


Figura 9: Estrutura química do Praziquantel (fórmula química - $C_{19}H_{24}N_2O_2$)
Fonte: <http://commonchemistry.org>

Actualmente, a principal estratégia da OMS no controlo da morbilidade provocada pela infecção por *S. mansoni* passa pelo tratamento farmacológico com: Oxamniquina e Praziquantel. O Praziquantel é o fármaco mais utilizado sem associações o que tem contribuído para o aumento de notificações sobre casos de resistência, falha do tratamento terapêutico e aumento de reacções de sensibilidade.

Praziquantel

É um anti-helmíntico antiparasitário de amplo espectro, contra numerosas espécies pertencentes à classe Trematoda e Cestoda.

A acção deste fármaco provoca a inibição da bomba de fluxo dos iões Na^+ e K^+ das células do *Schistosoma spp.*, aumentando a permeabilidade a iões como Ca^{2+} , gerando uma intensificação da contractilidade muscular seguida de paralisia. Este helminta não se consegue fixar sendo expulso para fora do organismo.

Na 59ª Reunião da Sociedade Americana de Higiene e Medicina Tropical (ASTMH) datada de Novembro de 2010, Dr. Piero Olliaro reafirmava que a dose recomendada de Praziquantel pela OMS é de 40mg/kg e que é necessário dar continuidade a tratamentos com fármacos que já demonstraram a sua eficácia mas que a sua produção tem vindo a ser limitada, como a Oxamniquina.

A principal estratégia da OMS na redução da infecção é realizar tratamento a crianças através de sistema educativo, mulheres gestantes e lactentes e populações de risco através dos serviços de saúde, onde os dos países endémicos devem ter disponíveis os anti-helmínticos.

O tratamento com praziquantel deve ocorrer uma vez por ano em comunidades de alto risco, uma vez a cada dois anos em comunidades de risco moderado, e duas vezes durante o período de idade escolar primária em comunidades de baixo risco (*Preventive chemotherapy in human helminthiasis*, 2006).

Em 2010, definiu-se que pelo menos cerca de 75% a 100% de crianças em idade escolar, nos países endémicos, receberiam tratamento farmacológico em relação à Schistosomose e às Geohelmintoses. (OMS, 2001)

Estes fármacos apesar de contribuírem para a redução da morbilidade, não representam uma solução para a erradicação da doença, pois sozinhos não permitem a interrupção do ciclo de transmissão. A resistência a estes fármacos tem sido relatada (Gryseels *et al*, 2001; Alonso *et al*, 2006) no entanto, ainda não se tornou um facto generalizado (Steinauer *et al*, 2008).

1.5.6. Factores de transmissão e medidas de protecção e controlo

Os seguintes factores poderão influenciar o risco de transmissão tanto a nível de influência da sobrevivência de *S. mansoni* bem como do molusco do género *Biomphalaria spp.*:

- Climatéricos: temperatura (28°C), precipitação e luminosidade intensa;
- Físico-químicos: níveis de oxigenação, velocidade e pH da água e flora aquática (Souza *et al*, 2011);

Existem ainda factores que influenciam a frequência e a intensidade de exposição à água infectada:

- Factores sócio-económicos e de comportamento: contacto e abastecimento de água e instalações sanitárias,

Actualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem apoiado os países e organizações no sentido de providenciar e implementar programas de controlo de transmissão. A aposta nas áreas de educação e instalação sanitária e educação para a saúde, a utilização normativa de fármacos e a continuidade da investigação farmacológica, e o combate aos moluscos, sustentam os programas nacionais dos países endémicos que têm vindo a ser instituídos e que têm tido sucesso no impacto do controlo e redução da Schistosomose no mundo.

1.6. Métodos moleculares

As técnicas de abordagem molecular utilizam métodos de detecção de DNA nas diferentes fases do ciclo de vida de *S. mansoni*, analisando amostras biológicas como: fezes, tecidos de moluscos, e água contaminada, permitindo o diagnóstico definitivo da infecção, a identificação e monitorização dos locais de transmissão (Abath *et al*, 2006) da prevalência e da intensidade de infecção reduzida e monitorização do pós-tratamento (Pontes *et al*, 2002).

1.6.1. PCR

A técnica de PCR – Reacção em cadeia de polimerização enzimática, permite a amplificação de sequências de DNA, tendo sido desenvolvida no início da década de oitenta (Videira, 2009) por Kary Mullis em 1983 (Ferreira *et al*, 2002).

Esta técnica integrada na moderna biotecnologia molecular necessita de:

- Amostra de DNA que se quer amplificar;
- Dois *primers* oligonucleótidos iniciadores;
- Desoxinucleótidos constituintes do DNA (dNTP's);
- Co-factor Mg^{2+} ;
- Enzima para síntese de DNA, como a Taq polimerase. Esta DNA polimerase termo-resistente foi isolada da bactéria *Thermus aquaticus* (Videira, 2009), que vivendo e sendo resistente a elevadas temperaturas não é necessário repô-la ao final de cada ciclo, permitindo a automação deste método.

Esta mistura é submetida a sucessivos ciclos de amplificação que envolvem:

- Desnaturação da amostra de DNA por aquecimento de modo a separar as cadeias simples. Geralmente ocorre entre 94-96°C durante 1 min.
- Hibridação de cada um dos dois *primers* com as cadeias simples resultantes da desnaturação de DNA. Esta associação é permitida após um arrefecimento, podendo ocorrer entre 50 e 65°C.

- Síntese de DNA através da elongação enzimática dos *primers* por adição de nucleótidos, catalisada pela DNA polimerase a 68° C – 72° C.

Estas reacções sucessivas são efectuadas em termociclador, podendo ser programável tanto o tempo de reacção como as temperaturas em que as mesmas ocorrem. Os produtos amplificados podem ser visualizados por electroforese em gel e coloração com brometo de etídio que emite fluorescência aquando exposto a luz ultravioleta (UV)

No sentido do desenvolvimento e avaliação de novas estratégias e ferramentas para o controle da doença, a OMS recomenda a aplicação da técnica de PCR para a detecção de *S. mansoni* (OMS, 2004). Pontes *et al.* (2002), desenvolveu um protocolo de PCR para detecção de DNA de *S. mansoni* em amostras fecais e soro humano, permitindo detectar um mínimo de aproximadamente 2,4 ovos por grama de fezes, demonstrando uma elevada sensibilidade da técnica quando comparada ao método Kato-katz e uma elevada especificidade não originando reacções cruzadas com DNA de outros helmintas.

Este método tem mostrado não só utilidade na abordagem clínica, como também no estudo do género *Schistosoma spp.*, permitindo a determinação do sexo das cercárias, a clonagem e sequenciação de genes específicos, na determinação da variabilidade genética e estrutura populacional inter- e intra-espécies e no desenvolvimento e aplicação de novas técnicas que gerem *Expressed Sequence Tags* (EST's), (Pontes *et al.*, 2002).

Os membros da família de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) constituem a maior família de proteínas transmembranares e estão presentes em todos os seres vivos (Higgins, 1992). Estes transportadores que possuem várias bombas de efluxo ATP-dependentes (Trifosfato de Adenosina) para realizar determinados processos biológicos relacionados com a resistência a fármacos, podendo no entanto também estarem envolvidos em funções fisiológicas no transporte de metabolitos tóxicos e xenóbioticos, protecção e secreção. O fenómeno de resistência a múltiplos fármacos leva a uma diminuição da concentração intracelular dos fármacos, atribuindo-se à super-expressão dos transportadores *ATP-binding cassette*.

Dois grupos de proteínas resistentes a múltiplos fármacos (MDR), isto é, que conferem resistência aos fármacos incluem, não estando limitados, a P-glicoproteína (gene símbolo ABCB1), a proteína de resistência a múltiplos fármacos 1 (MRP1, gene símbolo ABCC1), MRP2 (gene símbolo ABCC2) (Leslie *et al*, 2005).

Em *Schistosoma* adulto estes mecanismos provavelmente incluem o uso destas proteínas transportadoras, havendo uma complementaridade e sobreposição de funções específicas incluindo a regulação da resposta imune. São assim capazes de transportar não só os conjugados aniônicos orgânicos, como também permitem eliminar os seus próprios metabolitos tóxicos, assim como compostos derivados do hospedeiro (Kasinathan *et al*, 2010).

Diversos estudos de resistência a anti-helmínticos que envolvem PCR, a expressão do nível destes transportadores estão alterados, revelam resultados a nível de sensibilidade ao Praziquantel tendo em conta o estágio e espécie do género *Schistosoma* sp.. Actualmente, sabe-se que a expressão de P-glicoproteína de *Schistosoma mansoni* (SMDR2) e o gene MRP, homólogo dos mamíferos para *Schistosoma* - SmMRP1 que codificam para as duas proteínas transportadoras da família ABC, têm uma expressão aumentada em vermes expostos a baixas concentrações de Praziquantel. No entanto, SmMRP1 encontra-se com uma expressão mais aumentada em machos do que em fêmeas (Kasinathan *et al*, 2010).

A primeira região de DNA repetitivo descrita em *S. mansoni* consistiu do complexo génico que codifica o RNA ribossomal (rDNA 18S) (Simpson *et al.*, 1984; Van Keulen *et al.*, 1985). Este gene que codifica a subunidade pequena do RNA ribossomal está presente em torno de 100 unidades do genoma haplóide, constituindo unidades repetitivas em tandem conservadas e variáveis.

1.6.2. RAPD-PCR

Esta técnica aumenta a possibilidade de análise de polimorfismos, sem necessidade de conhecimento prévio dos genes e/ou sequências genómicas de interesse (Haggag *et al*, 2006). Tem sido utilizada para a detecção de polimorfismos intra-específicos das espécies e estirpes de *S. mansoni* (Neto *et al*, 1993), e no estudo da sua variabilidade genética.

Verificam-se diferenças fenóticas significativas entre e inter-populações geográficas de *S. mansoni*., que se manifestam quanto: à adaptabilidade ao género *Biomphalaria sp.*; ao grau de infecção em mamíferos, quer no laboratório ou em condições naturais; e nas diferentes respostas ao tratamento farmacológico (Curtis *et al*, 2000), o que aumenta a probabilidade de evolução da resistência a fármacos (Steinauer *et al*, 2008). Já foram descritas estirpes de *S. mansoni* resistentes à Oxamniquina, e verificou-se que estirpes do parasita no Senegal e Egipto reduziram a sua sensibilidade ao Praziquantel. As diferenças genéticas entre estirpes de *S. mansoni* destas áreas endémicas, sensíveis e resistentes a Oxamniquina ou Praziquantel foram analisadas utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD, sendo que os resultados destas análises indicam que é possível diferenciar estirpes sensíveis e resistentes aos fármacos, com o uso de marcadores moleculares do tipo RAPD (Tsai *et al.*, 2000).

Denominados de Opis, estes *primers* oligonucleótidos, foram seleccionados e obtidos da *Operon Technology Inc.*, sendo definidos com uma sequência contida de cerca de 60% a 70% de GC. Tsai *et al* (2000) define o grau de amplificação eficaz de cada um dos 20 *primers* seleccionado – (“+++” eficácia elevada de amplificação e “++” com média eficácia) e dentro destes interpreta quais os *primers* com maior capacidade de diferenciação de padrão de bandas entre linhagens de *S. mansoni* resistentes e sensíveis.

1.7.Objectivos

Face a esta problemática, e para a realização deste estudo, foram então propostos os seus objectivos.

1.7.1. Objectivo Geral

Comparar variações de padrões de polimorfismos genéticos de cercárias sob a análise de bandas obtidas através de electroforese em gel de poliacrilamida, que poderão estar associados a padrões de resistência ou sensibilidade ao Praziquantel.

1.7.2. Objectivos Específicos

- Compreender a importância do fenómeno de resistência ao fármaco Praziquantel a nível de Saúde Pública;
- Aplicar a técnica de biologia molecular RAPD-PCR utilizando *primers* da *Operon Technology Inc.*, segundo método de Tsai *et al* (2000) para identificação de possíveis padrões de bandas de polimorfismos que poderão estar associadas a menor ou maior grau de sensibilidade;
- Comparar padrões de bandas obtidos em gel de poliacrilamida, representantes de amplificação de DNA de cercárias sensíveis e resistentes ao fármaco Praziquantel utilizando *primers* distintos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Seleção e identificação dos murganhos a infectar

Para o estudo da diversidade genética baseada em marcadores RAPD, utilizaram-se amostras de DNA de vermes de *S. mansoni* existentes no sistema-porta intra-hepático de murganhos procedentes de dois grupos experimentais de isolados de *S. mansoni*.

- Grupo de murganhos do ensaio de resistência ao Praziquantel (**Er**) – cercárias que foram obtidas a partir de moluscos infectados por miracídios produzidos por vermes adultos resistentes ao Praziquantel. Infecção de murganhos por vermes de *S. mansoni* estirpe Belo Horizonte (BH) que foram seleccionados por pressão de fármaco e são resistentes a 70mg/kg de Praziquantel administrado em dose única entre o 27-38º dia após infecção. Submetidos a sete passagens sucessivas por pressão de fármaco fazendo o ciclo completo de infecção após 8 semanas (murganho-caracol-murganho).
- Grupo de murganhos do ensaio sensível (**Es**) – cercárias que foram obtidas a partir de moluscos infectados por miracídios produzidos por vermes adultos sensíveis ao Praziquantel. Infecção de murganhos por cercárias mantidas em ciclo, na Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica/Helminologia (UEIPM) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT).

2.1.1. Condições de acondicionamento dos murganhos

Os murganhos com cerca de 20g foram mantidos numa sala isolada do Biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) em caixas experimentais identificadas e mantendo-se o fornecimento de ração e a reposição de água. Permaneceram em condições ambientais específicas com uma temperatura de 21º C

com variação de $\pm 1^{\circ}\text{C}$, entre 45% e 55% de humidade, e com luminosidade em ciclos de 12 horas na luz escuridão.

2.1.2. Administração de Praziquantel

Foi administrado ao grupo de ensaio de resistência o equivalente a 70 mg/Kg de Praziquantel em dose única, tendo este sido previamente submetido a sete passagens sucessivas por pressão crescente de fármaco fazendo o ciclo completo de infecção (murganho-caracol-murganho).

2.2. Obtenção de isolados de *S. mansoni*

2.2.1. Recolha de vermes e ovos através de murganhos

Os murganhos foram sacrificados através de uma injeção intraperitoneal com 0,4 ml de Penthonal® sódico (20 mg). A cada murganho foi realizado um corte transversal na pele, afastando o tecido abdominal e torácico, e cortando o esterno removendo assim o diafragma. Através de uma incisão veia porta, extraiu-se o fígado contendo granulomas. Na artéria torácica, é injectada lentamente cerca de 10 ml de Líquido de Perfusão, provocando o arrastamento de vermes contidos nos vasos hepáticos directamente para um copo de sedimentação. Aqui adiciona-se água e realizam-se várias lavagens até esta se tornar límpida, por fim a parte sedimentada coloca-se numa caixa de Petri para contabilização, sob microscópio, dos vermes machos e fêmeas. Estes foram colocados em tubo de ensaio, sob NaCl a 0,9%, fixadas em etanol a 70% e armazenadas a -20°C no laboratório da UEIPM.

2.3. Dissecção e extracção de DNA de cercárias

O DNA das cercárias provenientes do ensaio de resistência (**Er**) e do ensaio sensível (**Es**) foram extraídas por dois métodos diferentes, com algumas alterações.

2.3.1. Extracção do DNA de cercárias através do kit de extracção (QUIamp® - DNA mini kit 1250)

O protocolo utilizado foi o kit de extracção de DNA de cercárias existente no laboratório da UEIPM.

Adicionou-se 40 µl de proteinase K num tubo de *ependorf* 1,5 ml a 400 µl de cercárias (4/5 cercárias) e acrescentou-se 400 µl de Tampão A1. Após vortexar incubou-se a 56°C durante 15 minutos.

Aplicou-se uma centrifugação rápida, aproximadamente 14853 xg e acrescentou-se 400 µl de etanol absoluto frio. Homogeneizou-se e deixou-se a mistura repousar 10 minutos, no fim do qual foi realizada nova centrifugação rápida (14853xg).

A mistura foi transferida por completo para tubos com filtro e centrifugou-se a 9140 xg durante 1 minuto. Descartou-se o líquido do tubo colector. Adicionou-se 500 µl de AW1 e centrifugou-se novamente a 9140 xg.

Substituiu-se o tubo e adicionou-se 500µ de Aw2 e fez-se nova centrifugação a 15996 xg durante 3 minutos. Descartou-se e colocou-se a mistura em novos tubos de 1,5ml. Adicionou-se 200 µl de AE e após repouso da mistura por 5 minutos centrifugou-se a 9140 xg durante 1 minutos.

Conservou-se as amostras de extracção no congelador a -20°C no laboratório da UEIPM.

2.3.2. Extracção do DNA de cercárias através do Método modificado de CTAB (Cetyltrimetihylammonium Bromide, Amnesco ® - C₉H₄₂NBr) **(Adaptado de Stothard 1998)**

Em dois tubos de *ependorf*, adicionou-se 400 µl (4/5 cercárias) e acrescentou-se 400 µl de tampão CTAB previamente aquecido na estufa (Memmert 3722L, *Fisher Scientific*) a 60° C durante 10 minutos. Foram adicionados 10 µl de proteinase K e submeteu-se a centrifugação rápida de 14853 xg (Microlite Centrifuges Z160M,

HERMLE LaborTechnik). A mistura foi incubada a 55° C durante 90 minutos, complementada com agitação manual de 15 em 15 minutos.

A mistura foi submetida a extracção por Clorofórmio: Isoamyl (24:1), seguido de agitação por inversão durante 2 minutos e centrifugou-se novamente 14853 xg.

Em tubos novos de *ependorf* adicionou-se 800 µl de etanol absoluto frio e retirou-se o sobrenadante para os novos tubos de modo a visualizar a precipitação. A mistura passou por nova centrifugação a 14853 xg durante 20 minutos. Voltou-se a descartar o sobrenadante e realizar lavagem do *pellet* em 500 µl de etanol a 70%. Nova centrifugação a 14853 xg por 15 minutos. Declinou-se totalmente o sobrenadante e incubou-se a 55° C até ao máximo de 15 minutos, para secagem completa do *pellet*.

O DNA foi ressuspensão em 50 µl de TE (Tris EDTA, pH7), agitando-se o tubo de modo a que a *pellet* se dissolva.

As amostras finais foram designadas por Er e Es e conservadas no congelador do laboratório UEIPM a -20° C.

2.4. Amplificação de RAPD-PCR

2.4.1. Seleccção de *primers* e aplicação da técnica RAPD-PCR

Os *primers* utilizados para RAPD-PCR seleccionados foram Opi-03, Opi-05, Opi-07, Opi-08, Opi-09, Opi-12, Opi-17 da *Operon Technology, Inc.* descritos por Tsai *et al* (2000).

As amostras de DNA de cercárias extraído foram submetidas a reacções amplificação por meio da técnica de RAPD-PCR, utilizando-se *primers* aleatórios descritos na **Tabela 1** com base na selecção feita anteriormente.

Tabela 1: Sequências de oligonucleótidos aleatórios seleccionados

<i>Primers</i> (Eurofins MWG Operon)	Sequência Oligonucleótida 5'→3'
Opi – 03	CAG AAG CCC A
Opi – 05	TGT TCC ACG G
Opi – 07	CAG CGA CAA G
Opi – 08	TTT GCC CGG T
Opi – 09	TGG AGA GCA G
Opi – 12	AGA GGG CAG A
Opi – 17	GGT GGT GAT G

Os volumes utilizados estão descritos na **Tabela 2**, tendo sido utilizado o kit IllustraTMpuReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare).

Tabela 2: Volumes utilizados nas reacções de amplificação das amostras de DNA para cada *primer* seleccionado.

	x 1	x 10
Primer	1 µ	10 µ
MgCl₂	0,1 µ	1 µ
H₂O	21,4 µ	214 µ
	23 µ	230 µ
DNA de amostra	2,5 µ	
H₂O	2,5 µ para Controlos Negativos	

As condições amplificação de RAPD-PCR estão enumeradas na **Tabela 3**, tendo sido depois submetidas a amplificação aleatória em termociclador (AVISO®, GmBH Mechatronic Systems).

Tabela 3: Condições de amplificação de DNA por RAPD-PCR seleccionado.

	T° C	Nº Ciclos	Tempo Total
Desnaturação Inicial	92° C – 5 min.	1 x	
1ª Etapa	94° C – 1 min.	45 x	5h30
2ª Etapa	34° C – 4 min.		
1ª Etapa	72° C – 2 min.		
2ª Etapa	72° C – 10min.	1 x	
Extensão Final	4° C – ∞		

2.4.2. Gel de Agarose

Para a detecção dos produtos de amplificação foi realizado uma electroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em 100 cc de TBE concentrado, corado com brometo de etídio concentrado (0,5µ/ml).

O marcador de pesos moleculares utilizado foi HyperLadder II (Bioline) de 2000 Pb. A electroforese decorreu a 90 volts, durante cerca de 90 minutos. As bandas foram visualizadas através de um transluminador de luz Ultra-Violeta (UV) – AlphaImager HP, Alpha Innotech.

2.4.3. Gel de Poliacrilamida a 6%

Para melhor distinção das bandas de polimorfismos os produtos de amplificação de DNA foram submetidos a gel de poliacrilamida a 6% (**ANEXO A**) corado com brometo de etídio concentrado (0,5µ/ml) e por fim visualizados em transluminador de Luz UV. Para carregar os poços foi utilizado 3,5 µl de amostra de DNA, 1,5µl de “loading” e 5 µl de marcador molecular – HyperLadder II (Bioline) de 2000 Pb; já a electroforese realizou-se a 90 Volts.

2.4.4. Análise

Para avaliar a similaridade genética produzidos pelos diferentes ensaios utilizou-se o coeficiente de similaridade de Sorensen-Dice (1945). Este coeficiente de associação permite a construção de uma tabela de contingência aplicando a expressão $2a / (2a + b + c)$. Permite neste trabalho avaliar a relação entre o número de bandas comuns obtidas nos dois ensaios (2a), o número de bandas polimórficas identificáveis apenas no ensaio de resistência (a) e o valor numérico do padrão de bandas obtido apenas no ensaio sensível (Oliveira *et al*, 2008), indicando-nos através do valor (S) se as amostras são idênticas, semelhantes ou diferentes.

3. RESULTADOS

3.1. Métodos de extracção de DNA

Como foi descrito no capítulo anterior, foram utilizados dois métodos para extracção de DNA de cercárias, tendo sido possível seleccionar aquele que apresentou melhores resultados. Assim, o DNA genómico utilizado neste trabalho foi o obtido pelo Método modificado de CTAB (Adaptado de Stothard, 1998).

A. Protocolo do Método modificado de CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide, Amnesco® - C₉H₄₂NBr) (Adaptado de Stothard 1998)

Em dois tubos de *ependorf*, adicionou-se 400 µl (4/5 cercárias) e acrescentou-se 400 µl de tampão CTAB previamente aquecido na estufa (Memmert 3722L, *Fisher Scientific*) a 60° C durante 10 minutos. Foram adicionados 10 µl de proteinase K e submeteu-se a centrifugação rápida de 14853 xg (Microlite Centrifuges Z160M, *HERMLE LaborTechnik*). A mistura foi incubada a 55° C durante 90 minutos, complementada com agitação manual de 15 em 15 minutos.

A mistura foi submetida a extracção por Clorofórmio: Isoamyl (24:1), seguido de agitação por inversão durante 2 minutos e centrifugou-se novamente 14853 xg.

Em tubos novos de *ependorf* adicionou-se 800 µl de etanol absoluto frio e retirou-se o sobrenadante para os novos tubos de modo a visualizar a precipitação. A mistura passou por nova centrifugação a 14853 xg durante 20 minutos. Voltou-se a descartar o sobrenadante e realizar lavagem do *pellet* em 500 µl de etanol a 70%. Nova centrifugação a 14853 xg por 15 minutos. Declinou-se totalmente o sobrenadante e incubou-se a 55° C até ao máximo de 15 minutos, para secagem completa do *pellet*.

O DNA foi ressuspenso em 50 µl de TE (Tris EDTA, pH7), agitando-se o tubo de modo a que a *pellet* se dissolva.

As amostras finais foram designadas por Er e Es e conservadas no congelador do laboratório UEIPM a -20° C.

3.2.Quantificação de DNA genómico

Anteriormente à preparação das amostras para o RAPD-PCR, procedeu-se à quantificação do DNA, permitindo seleccionar as amostras mais adequadas e evitar eventuais ausências de amplificação e resultados. Após a extracção de DNA, as amostras foram quantificadas num gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio a 1,5% (p/V), anteriormente diluídas com água bidestilada. – 1:10, 1:30, 1:50. Os melhores resultados foram obtidos com a diluição 1:10, visto funcionar para ambos os ensaios.

3.3.Análise de Polimorfismos através de RAPD-PCR

3.3.1. Identificação de polimorfismos

De um total de sete *primers* testados, apenas três apresentaram resultados consistentes e reprodutíveis – Opi-09, Opi-12 e Opi-17. As análises das bandas obtidas por electroforese a 90V em gel de poliacrilamida a 6% (p/v) corado com brometo de etídio, foram comparadas a um marcador de peso molecular 2000 pb (HyperLadder II, Bioline) com o intuito de evidenciar sensibilidade ou resistência de *S. mansoni* ao Praziquantel.

3.3.2. Diferenças genéticas entre os ensaios

No presente estudo, foi analisada a variabilidade genética das cercárias de *Schistosoma mansoni* que foram obtidos a partir de moluscos infectados por miracídios obtidos por vermes adultos resistentes ao Praziquantel (**Er**) e cercárias que foram obtidas de moluscos infectados com miracídios obtidos de vermes sensíveis ao Praziquantel (**Es**).

Foram testados sete oligonucleótidos aleatórios (Opi-03, Opi-05, Opi-07, Opi-08, Opi-09, Opi-12 e Opi-17), sendo que destes apenas três apresentaram resultados consistentes e reprodutíveis nos dois ensaios, sendo eles os Opi-09, Opi-12 e o Opi-17. Os resultados aplicados aos restantes oligonucleótidos por serem pouco consistentes foram retirados do estudo (**Tabela 1**).

No geral, os pesos moleculares das bandas observadas nos géis de poliacrilamida variaram entre os 1200 pb a 150 pb, havendo uma maior concentração de bandas entre os 1000 pb e os 200pb (**Figuras 10, Figura 11 e Figura 12**).

Assim, com o oligonucleótido **Opi-09** “5'-TGGAGAGCAG-3'”, obteve-se um perfil electroforético semelhante em todas as amostras do ensaio sensível (**Es**), variando entre 600 e 300 pb (**Figura 10**).

Relativamente às amostras do ensaio de resistência (**Er**), os perfis obtidos variaram entre bandas com peso molecular entre os 600 pb e os 300 pb (**Figura 10**).

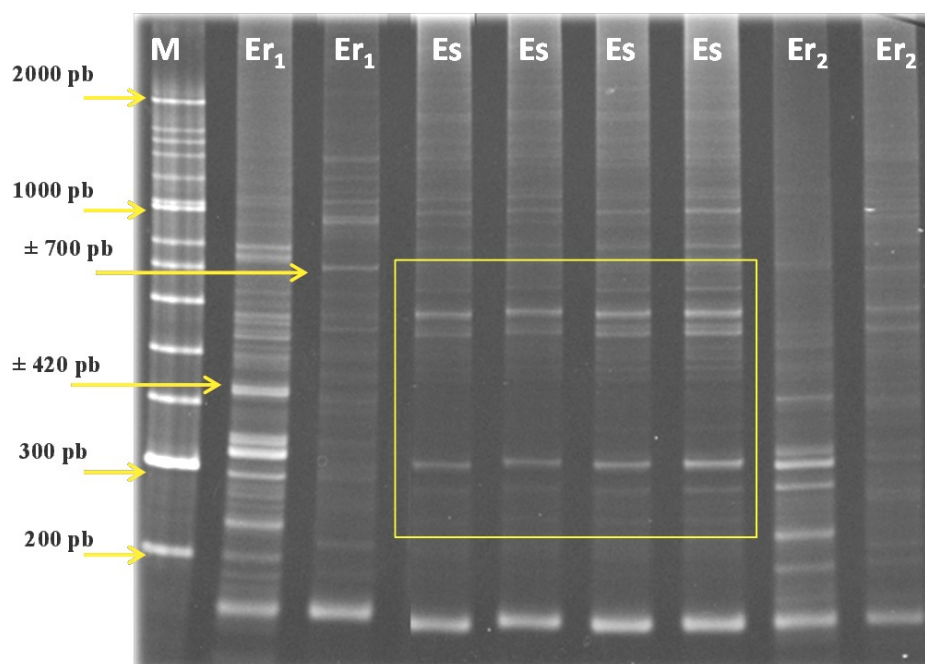


Figura 6: Amplificação do DNA de cercárias produzidas por moluscos infectados por miracídios produzidos por vermes de *S. mansoni* resistentes ao Praziquantel (**Er**) e cercárias produzidas por moluscos infectados por miracídios produzidos por vermes adultos de *S. mansoni* sensíveis ao Praziquantel (**Es**) com o *primer* **Opi-09**. M – Marcador de Peso Molecular (HipperLadder 2000pb). N – Controlo negativo.

Na **Figura 11**, estão representados os resultados correspondentes à amplificação com o oligonucleótido **Opi-12** “5’-AGAGGGCAGA-3’”. Pode-se observar a presença de duas bandas específicas nas amostras obtidas nos ensaios de resistência (**Er**) com um peso molecular aproximadamente de 150 pb. Vale a pena ressaltar que as amostras dos ensaios de sensibilidade apresentam os mesmos perfis electroforéticos, com um peso molecular que varia entre os 1000 pb e os 400 pb.

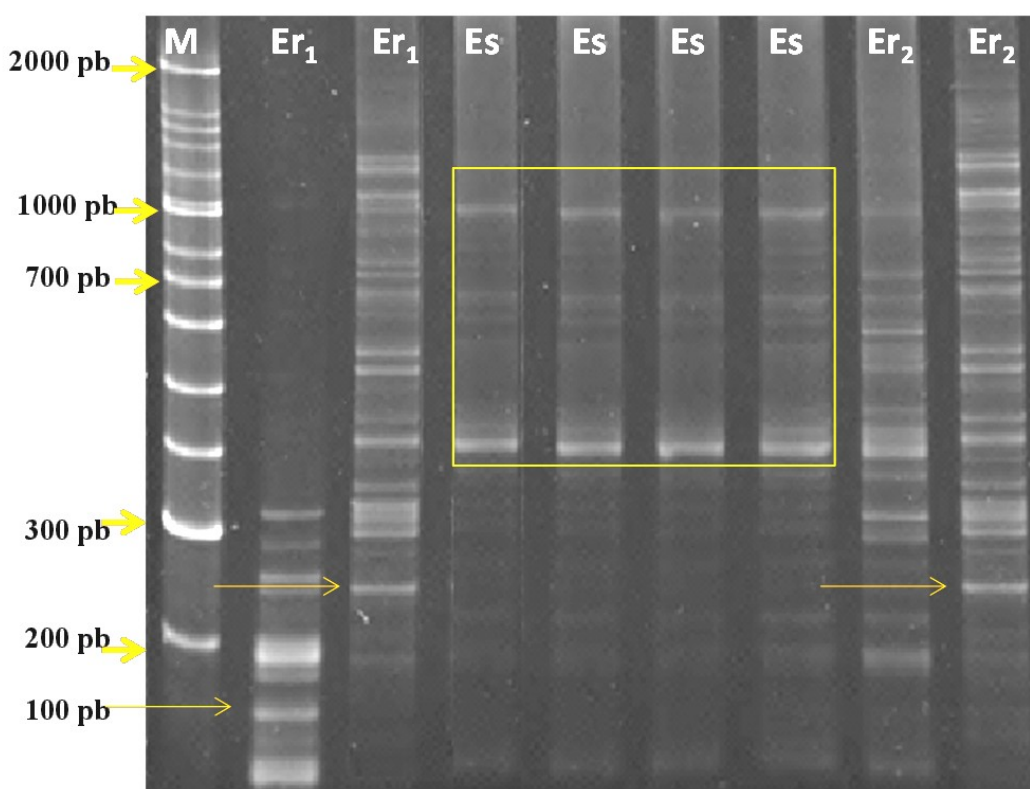


Figura 11: Amplificação do DNA de cercárias produzidas por moluscos infectados por miracídios produzidos por vermes de *S. mansoni* resistentes ao Praziquantel (**Er**) e cercárias produzidas por moluscos infectados por miracídios produzidos por vermes adultos de *S. mansoni* sensíveis ao Praziquantel (**Es**) com o primer **Opi-12**. M – Marcador de Peso Molecular (HipperLadder 2000pb). N – Controlo Negativo.

Na amplificação com o oligonucleótido **Opi-17** “5’-GGTGGTGATG-3’”, observa-se mais uma vez que as amostras pertencentes aos ensaios de sensibilidade apresentam todas, o mesmo perfil electroforético com bandas cujo peso molecular varia entre 900 pb e 400 pb (**Figura 12**).

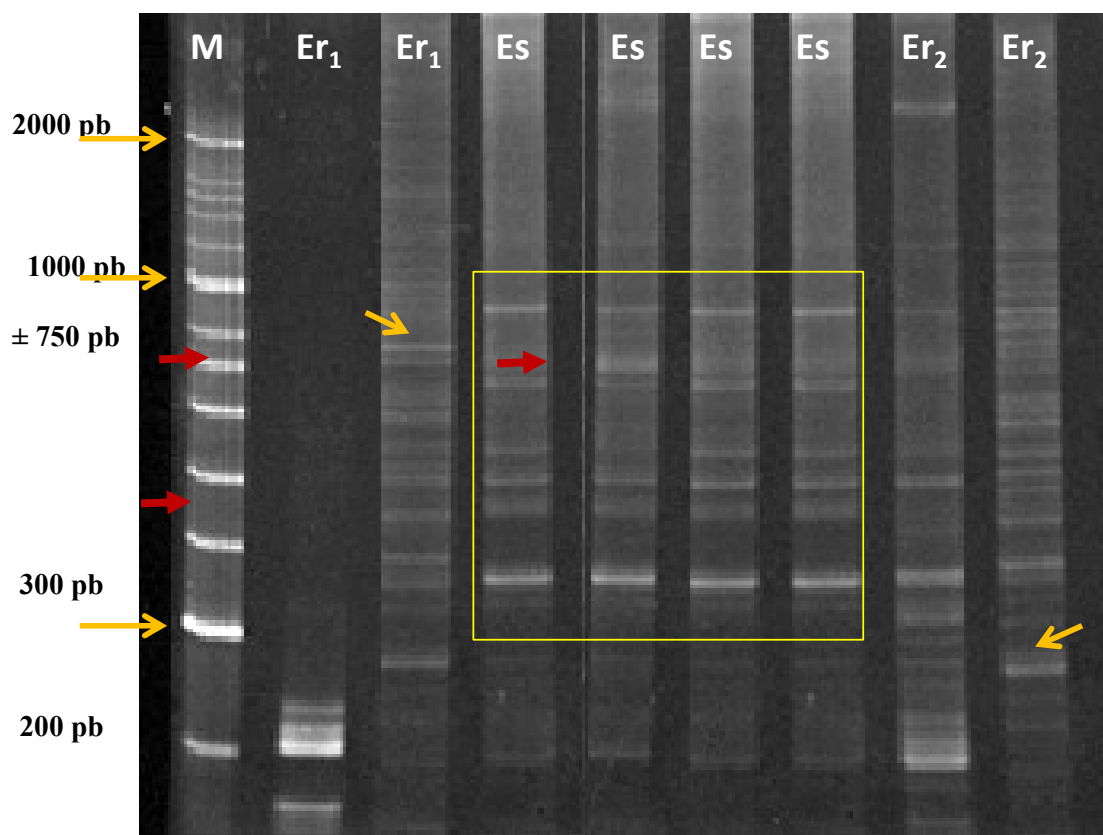


Figura 12: Amplificação do DNA de cercárias produzidas por moluscos infectados por miracídeos produzidos por vermes de *S. mansoni* resistentes ao Praziquantel (**Er**) e cercárias produzidas por moluscos infectados por miracídeos produzidos por vermes adultos de *S. mansoni* sensíveis ao Praziquantel (**Es**) com o *primer* **Opi-17**. M – Marcador de Peso Molecular (HipperLadder 2000pb). N – Controlo negativo.

Por outro lado, as amostras referentes aos ensaios de resistência (**Er**) parecem apresentar duas bandas específicas, uma com aproximadamente 750 pb e uma outra com aproximadamente 280 pb.

3.3.3 Análise dos Polimorfismos através do Coeficiente de Dice (*S*)

Como foi referido no capítulo anterior, a análise da variação genética entre os dois ensaios foi feita com recurso ao *Coeficiente de Dice (S)*, o qual nos permite definir se as amostras em estudo são similares ou diferentes.

Na **Tabela 4**, estão descritas os polimorfismos encontrados nos dois ensaios Er e Es aplicados aos três oligonucleótidos. Os resultados encontrados mostram que este Coeficiente de Similaridade não apresentou grandes variações entre os três oligonucleótidos, demonstrando que entre os dois ensaios parece não haver diferenças genéticas significativas entre eles.

Tabela 4: Coeficiente de similaridade de Dice (*S*) aplicado à diferença genética para os dois ensaios (Er e Es).

	<i>Primer</i> Opi 9	<i>Primer</i> Opi 12	<i>Primer</i> Opi 17
Nº de bandas em ambos os ensaios (a)	2	2	2
Nº de bandas existentes só no ensaio sensível (b)	2	3	3
Nº de bandas existentes só no ensaio resistente (c)	3	5	4
Coeficiente de Similaridade (<i>S</i>)	0,4	0,3	0,4

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Apesar do número de amostras e de *primers* oligonucleótidos neste estudo não ter sido elevado, permitiu-nos mesmo assim, obter resultados, ainda que preliminares, de polimorfismos associados ao fenótipo de fármaco-resistência ao Praziquantel.

A técnica moderna de biotecnológica de RAPD-PCR tem sido utilizada em estudos científicos que tem permitido a detecção de polimorfismos e marcadores genéticos que demonstrem variabilidade genética inter- e intra-espécies de *Schistosoma*, que possam essencialmente esclarecer a sua distribuição geográfica e contribuir para a epidemiologia molecular.

A utilização de RAPD-PCR nesta dissertação permitiu analisar as diferenças entre sequências, através da obtenção de polimorfismos de fragmentos de DNA que através dos *primers* identificados por a Operon Technology, Inc. (Tsai *et al*, 2000) foram submetidos a amplificação, podendo identificar alterações genómicas ou mesmo revelar um padrão genético único relacionado com a aquisição do fenómeno resistência/sensibilidade ao fármaco Praziquantel.

Assim, este trabalho baseou-se na metodologia de RAPD-PCR descritas por Tsai *et al* (2000) utilizando *primers* (Opi's) que foram pré-definidas como de elevada eficácia na amplificação da amostra, podendo estes estar ou não relacionados com a presença ou ausência de diferentes padrões de bandas que indicassem relação com o fenómeno de resistência no parasita *S. mansoni*. A identificação de polimorfismos neste trabalho baseou-se na comparação de padrões de bandas polimórficas reproduzidas em gel de poliacrilamida a 6% (Larson *et al* 1996).

Foram então utilizados três (Opi-09, Opi-12 e Opi-17) de sete *primers* disponíveis por revelarem uma eficiente amplificação das amostras submetidas a electroforese em gel de poliacrilamida a 6%, mesmo sendo difícil a identificação de bandas características pela qualidade do aparelho de UV utilizado.

Da amplificação de DNA através destes três *primers* infere-se uma alta eficácia de amplificação, revelando uma eficiente diferenciação de bandas específicas entre ensaio resistente e ensaio susceptível podendo distinguir-se padrões electroforéticos

para os ensaios sensíveis entre os 600pb e os 300pb (**Figura 10**), os 1000pb e os 400pb (**Figura 11**) e os 900pb e 400pb (**Figura 12**).

Por outro lado, nestes três *primers* são evidentes bandas que podem caracterizar um padrão genético de resistência ao Praziquantel pelas cercárias verificando-se claramente diferentes bandas sob peso molecular entre os 600 pb e 200 pb, estando de acordo com o descrito em Tsai *et al*, 2000. Na análise do padrão electroforético para os *primers* **Opi-12** e **Opi-17** verificam-se duas bandas resistentes (**Er**) específicas bem definidas em comum como é o caso de aproximadamente 280 pb (**Figura 11 e Figura 12**). Tal como descrito em Tsai *et al* (2000) foi com o *primer* **Opi-12** que se verificou uma maior diferenciação entre bandas sensíveis específicas e bandas resistentes específicas (**Tabela 4**).

O resultado do coeficiente de similaridade de Dice permite complementar a análise da observação dos padrões de bandas com os respectivos pesos moleculares, no entanto, apesar do resultado obtido ser diminuto e apesar de ser exequível inferir que o método de RAPD-PCR pode ser utilizado para distinguir diferenças em cercárias produzidas por caracóis previamente infectados por miracídios obtidos de vermes fenotipicamente susceptíveis e resistentes ao fármaco Praziquantel, o seu resultado acaba por não ser totalmente conclusivo.

Idealmente esta técnica biomolecular, para cada *primer* deve gerar um número de bandas superior a quatro e que fossem de diferentes distâncias de migração – polimorfismo, para cada um dos ensaios. De forma rápida e de baixo custo, este método permitiu testar um número considerável de *primers* e embora não seja uma técnica verdadeiramente aleatória permite identificar sequências de DNA que emparelham com os *primers* utilizados o que permite a reprodutibilidade dos mesmos resultados.

A identificação de um marcador de resistência ao fármaco Praziquantel em *S. mansoni* contribuirá para uma correcta análise de distribuição das diferentes linhagens de *S.mansoni* fármaco-resistentes e consequentemente seria um pré-requisito importante para o planeamento e monitorização de programas de prevenção e controlo da doença.

Após a análise de resultados deste trabalho preliminar pode-se concluir que:

- A análise por *Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction* (RAPD-PCR) adaptado do método utilizado por Tsai *et al* (2000) pode ser utilizada para diferenciar e identificar variabilidade genética entre o ensaio de resistência de cercárias da estirpe BH e o ensaio de cercárias sensíveis.
- Tal como referido em Tsai *et al* (2000) nos três *primers* utilizados observou-se diferenças entre o padrão de bandas de cercárias de *S. mansoni* fármaco-resistentes e de cercárias *S. mansoni* fármaco-sensíveis.
- Nos *primer* Opi-09, Opi-12 e Opi-17 evidencia-se não só a qualidade do DNA amplificado como também, uma favorável diferenciação do padrão de bandas polimórficas entre o ensaio resistente e sensível.
- Estes resultados, ainda que preliminares, revelam ser bastante promissores contribuindo assim, para uma melhor compreensão sobre o fenómeno de fármaco-resistência ao Praziquantel e aos seus mecanismos intrínsecos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, F. G. C., GOMES, A. L. V., MELO, F. L., BARBOSA, C. S., WERKHAUSER, R. P. (2006) – Molecular approaches for the detection of *Schistosoma mansoni*: possible applications in the detection of snail infection, monitoring of transmission sites, and diagnosis of human infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **101**:1 141-146.

ARRUNMOZI, S., SIGLER, L., BRANDT, M. (2007) – DNA and the classical way: Identification of medically important molds in the 21st century. *Medical Mycology*. **45** 475-490.

CURTIS, J. MINCHELLA, D. J.(2000) – Schistosomose Population Genetic Structure: When Clumping worms is not just Splitting Hairs. *Parasitology Today*. **16**:2 68-71.

FILHO, R. P., SILVEIRA, M. A. B. (2001) – Panorama atual de esquistossomíase no mundo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **37**:2 123-135.

GUARALDO, A. M. A., BASTOS, O. C., MAGALHÃES, L. A., RANGEL, H. A.(1981) – Diagnosis of mansoni schistosomiasis by means of immunofluorescent technique using sporocysts in planorbid tissues. *Revista de Saúde Pública*. **15**:6 623-628.

HAGGAG, S. H., EL-SCHERBINY, M. (2006) – Molecular markers associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in the *Biomphalaria glabrata* snails. *Biotechnology*. **5**:4 404-412.

KASINATHAN, R. S., MORGAN, W. M., GREENBERG, R. M. (2010) – *Schistosoma mansoni* express higher levels of multidrug resistance-associated protein 1 (SmMRP1) in juvenile worms and in response to Praziquantel. *Molecular & Biochemical Parasitology*. **173**:1 25-31.

MACDONALD, A. S., ARAÚJO, M. I., PEARCE, E. J. (2002) – Immunology of Parasitic Helminth Infections. *American Society for Microbiology*. **70**:2 427-433.

MAIZELS, R. M., YAZDANBAKHS, M. (2003) – Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature reviews: Immunology*. **3**:9 733-744.

MORGAN, J. A. T. *ET AL.* (2002) – A phylogeny of planorbid snails with implications for the evaluation of *Schistosoma* parasites. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **25** 477-488.

MORGAN, J. A. T. *ET AL.* (2005) – Origin and diversification of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Molecular Ecology*. **14**:12 3889-3902.

NOYA, O., NOYA, B. A., LOSADA, S., COLMENARES, C., GUZMÁN, C., LORENZO, M. A., BERMÚDEZ, H. (2002) – Laboratory Diagnosis of Schistosomiasis in Areas of Low Transmission. *A Review of a Line of Research*. **97**:2 167-169.

OLIVEIRA, A. L. D., SILVA, D., ZANOTTI-MAGALHAES, E. M., ABDEL-HAMID, A. Z., RIBEIRO-PAES, J. T. (2008) – Schistosome/mollusk: genetic compatibility. Online Journal: *Genetics and Molecular Research*. **7**:2 518-526.

OLIVEIRA, E. J., KANAMURA, H. Y., DIAS, L. C. S., SOARES, L. C. B., LIMA, D. M. C., CIARAVOLHO, R. M. C. (2003) – IgM-ELISA for diagnosis of schistosomiasis mansoni in low endemic areas. *Cadernos de Saúde Pública*. **19**:1 255-261.

PICA-MATTOCCIA, L., DOENHOFF M. J., VALLE, C., BASSO, A., TROIANI, A. R., LIBERTI, P., FESTUCCI, A., GUIDI, A., CIOLI, D. 2009 – Genetic analysis of decreased Praziquantel sensitivity in a laboratory strain of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*. **111**:1 82-85.

PINCUS, D. H., ORENGA, S., CHATELLIER, S. (2007) – Yeast identification – past, present and future methods. *Medical Mycology*. **45**:2 97-121.

PONTES, L. A., DIAS-NETO, E., RABELLO, A. 2002 – Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **66**:2 157-162.

PONTES, L. A., OLIVEIRA, M. C., KATZ, N., DIAS-NETO, E., RABELLO, A. (2003) – Comparison of a polymerase chain reaction and the kato-katz technique for

diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 68:6 652-656.

SORIANO, J. L. (2004) – Técnicas de Biología Molecular Aplicadas a la Taxonomía y Filogenia de Moluscos. *Revista de l'Associació Catalana de Malacologia*. 1:4 23-33.

SOUZA, F. P. C., RODRIGO, R. V., COSTA, A. P., JÚNIOR, F. C. F., SANTANA, L. A., GOMES, A. P. (2011) – Schistosomiasis mansoni: general aspects, immunology, pathogenesis and natural history. *Revista Brasileira Clínica Médica São Paulo*. 9:4 300-307.

STEINER, J. J., AGOLA, L. E., MWANGI, I. N.M MKOJI, G. M., LOKER, E. S. (2008) - Molecular epidemiology of *Schistosoma mansoni*: a robust, high-throughput method to assess multiple microsatellite markers from individual miracidia. *Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary genetics in infectious diseases*. 8:1 68-73

STEINER, J. J., POLDEMBA, C. J., FJELLSTROM, R. G., ELLIOT, L. F. (1995) – A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Research*. 23:13 2569-2570.

TURNER, P., LALLOO, K., BLIGH, J., WHITTY, C. J. M., DOENHOFF, M. J., CHIODINI, P. L. (2004) – Serological speciation of human schistosome infections by ELISA with a panel of three antigens. *Journal of Clinical Pathology*. 57:11 1193-1196.

TSAY, M., MARX, K. A., ISMAIL, M. M., TAO, L. (2000) – Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction assay for identification of *Schistosoma mansoni* strains sensitive or tolerant to anti-schistosomal drugs. *Journal of Parasitology*. 86:1 146-149.

ZWINGENBERGER, K., NOGUEIRA, J. A., QUEIROZ, A., POGGENSEE, U., ALECAR, J. E., VALDEGUNAS, J., ESMERALDA, F., FELDMIEIER, H. (1987) – Efficacy of Oxaminiquine, Praziquantel and a combination of both drugs in schistosomiasis mansoni in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo*. 29:5.

BOGITSH, B. J. & CHENG, T. C. – *Human Parasitology*. 2ª Edição. Califórnia: Academic Press, 1998. ISBN 9780120884681

NEVES, D., MELO, A. L., LINARDI, P. M., VITOR, R. W. A. – *Parasitologia Humana*. 11ª Edição. Atheneu, 2004. ISBN 8573797371

REY, L. – *Parasitologia*. 3ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S/A, 2001. ISBN 8527714787

FERREIRA, W. C., SOUSA, J. C. – *Microbiologia*: Volume 1. Editora LIDEL, 2002. ISBN 9727570240.

NP 405-1 (1994). *Norma Portuguesa para referências bibliográficas: Documentos impressos*. Instituto Português da Qualidade, Ministério da Indústria e Energia. Lisboa.

NP 405-2 (1998). *Norma Portuguesa para referências bibliográficas: Parte 2: Materiais não livro*. Instituto Português da Qualidade, Ministério da Indústria e Energia. Lisboa.

NP 405-3 (2000). *Norma Portuguesa para referências bibliográficas: Parte 3: Documentos não publicados*. Instituto Português da Qualidade, Ministério da Indústria e Energia. Lisboa.

NP 405-4 (2002). *Norma Portuguesa para referências bibliográficas: Parte 4: Documentos electrónicos*. Instituto Português da Qualidade, Ministério da Indústria e Energia. Lisboa.

World Health Organization (2007). *Action Against Worms*. Acedido em: 22 de Maio de 2011, em: http://www.who.int/wormcontrol/newsletter/PPC8_eng.pdf.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S., DEMARCO, R. (2004) – Genoma contra a esquistossomose. Acedido em 22 de Maio de 2011, em: http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/genoma_contra_a_esquistossomose_5.html.

ANEXOS

Anexo A - Protocolo de Electroforese de DNA em minigel de Poliacrilamida a 6% (Adaptado do Protocolo existente na UEIPM)

1. Reagentes Utilizados e respectivos volumes:

- Acrilamida: Bisacrilamida (29:1) (30% w/v)
 - Constituintes:
30g de acrilamida
0,8g de bis-acrilamida ($C_7H_{10}N_2O_2$)
H₂O d.d. até perfazer o volume de 100ml
- Persulfato de Amónio (10% w/v) – APS
 - Constituintes:
0,1g de Persulfato de amónio $[(NH_4)_2S_2O_8]$ em 100 ml de H₂O d.d. em tubo de *eppendorf*.
Acondicionado a 4°C, envolvido em papel de alumínio até á sua utilização.
- TEMED ($N_5N_5N^8_5N_8$ -tetra-methyl-ethylenediamine)
- TBE 5x
- H₂O d.d.

1.1 Preparação de dois minigéis de Poliacrilamida 6%

- Limpar bem as placas com água d.d. e em seguida com álcool; depois montar a “*cassette*” que serve de base para a formação do gel:
- Os separadores devem estar rectilíneos em relação às margens das placas de vidro; os suportes laterais devem ser apertados na diagonal;

- Após a colocação das placas no suporte, os fixadores devem ser colocados em simultâneo e rodados para aposição vertical também ao mesmo tempo;
- Colocar os pentes. Colocar uma tira vedante nas bases do suporte das placas de vidro de modo a impedir o escoamento do gel antes de polimerizar.
- Prepara-se o gel de poliacrilamida a 6% com os respectivos volumes:
30% Acrilamida (29:1) – 2,4 ml, H₂O d.d. – 7,2 ml, 5x TBE – 2,4 ml,
10% APS – 200 µl, TEMED – 10 µl
- Retirar cerca de 20 ml da solução e colocar o gel lentamente em cada “cassette”, colocando a agulha junto à superfície lateral de cada separador e deixar polimerizar a temperatura ambiente cerca de 20/30min.
- Findo o tempo de polimerização retirar o pente lentamente, para não danificar os poços, e colocar cada gel na tina, em posição vertical, no aparelho de electroforese – *Electrophoresis Power Supply (EPS600)*, *Pharmacia Biotech*, embebido em TBE 1x.
- Colocar as amostras lentamente nos respectivos poços com micropipeta.
- Colocar a tampa na tina, verificando que os polos negativo e positivo estão inseridos no local correcto. Ligar o aparelho de electroforese e regular a voltagem desejada.

